

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49(11): 1454 - 1458; 4 November 2009  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 报告基因法比较两种放线菌启动子的活性

李佳<sup>1#</sup>, 向四海<sup>2#</sup>, 杨秀山<sup>1\*</sup>, 杨克迁<sup>2\*</sup>

<sup>(1)</sup> 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

<sup>(2)</sup> 中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要:**【目的】比较启动子 *Psf* 与红霉素抗性基因启动子 (*PermE* \*) 在链霉菌中的表达强度差异。【方法】本文利用卡那霉素抗性梯度以及邻苯二酚 2,3-双加氧酶显色系统, 比较了两个启动子的表达差异。【结果】两个启动子在棒状链霉菌 (*Streptomyces clavuligerus*) NRRL3585、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) M145, 委内瑞拉链霉菌 (*Streptomyces venezuelae*) ISP5230 及变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans* TK54) 均高表达。在棒状链霉菌和天蓝色链霉菌中 *Psf* 的表达活性要强于 *PermE* \*。【结论】*Psf* 和 *PermE* \* 是适用于链霉菌的高活性启动子。这些数据为两个启动子的使用提供了参考依据, 也为链霉菌基因表达元件提供了新的选择。

**关键词:** 强启动子; 链霉菌; 报告基因

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2009) 11-1454-05

链霉菌 (*Streptomyces*) 是一类主要来源于土壤的高 G + C% 含量革兰氏阳性菌, 有复杂的形态结构、生活周期及次级代谢。它的代谢过程是一个非常复杂、相互偶联的多层次调控过程, 而启动子和其它顺式调控序列构成了这个调控系统中的基础部分。链霉菌基因的启动子结构具有多样性<sup>[1]</sup>, 在转录模式上普遍存在复杂性, 有很多含有多重启动子的调控区, 如红霉素抗性基因 (*ermE*)<sup>[2]</sup>、氨基糖苷磷酸转移酶基因 (*aph*)、十一烷基灵菌红素转录激活基因 (*redD*)<sup>[3]</sup> 等, 都含有重叠的、分歧的启动子, 这种结构可能和复杂的调控模式有关。链霉菌不仅产多种次级代谢产物, 还高产很多水解酶, 是一类有重要工业价值的微生物。因此, 链霉菌是合成生物学研究目标之一。而高活性启动子是合成生物学操作的基本而必要元件, 对这些元件功能的认识有利于它们的运用。选用适当的启动子对于操控目标基因的表达水平至关重要。

红霉素抗性基因启动子 (*PermE*) 来源于红色糖多孢菌的红霉素合成基因簇, 位于 *ermE* 和 *eryC* 之间, 是一种在链霉菌中组成型表达的强启动子。它是一个多重启动子, 具有两对 -10 和 -35 区, 方向相同, 两个 -35 区间隔 74 bp, 具有两个转录起始位点 (见图 1)。启动子区 G + C% 含量较高 (62% ~ 65%), 其中 *PermE* II 的 -10 和 -35 区保守序列的间隔符合原核生物强启动子的最佳间隔  $17 \pm 1$  bp, 而 *PermE* I 的 -10 和 -35 区间隔距离要小于 *PermE* II, 可能暗示其启动子活性也弱于 *PermE* II。对启动子区中的 *PermE* I 的 -35 区的 TGG 密码子进行缺失突变, 获得了更强的启动子 *PermE* \*<sup>[4-5]</sup>。

在已知的链霉菌强启动子中, 除红霉素抗性基因启动子外, 对其它强启动子研究较少。本研究的启动子 *Psf* 是从 *Streptomyces ghanaensis* phage I19 中得到的强启动子<sup>[6]</sup>, 与 *PermE* \* 相同, *Psf* 也是一个

\* 通信作者。杨秀山, Tel: +86-10-68902330, E-mail: [cnu\\_xs yang@263.net](mailto:cnu_xs yang@263.net); 杨克迁, Tel: +86-10-64807459, E-mail: [yangkq@im.ac.cn](mailto:yangkq@im.ac.cn)

作者简介: # 并列第一作者。李佳 (1983 - ), 女, 辽宁省人, 硕士研究生, 主要从事链霉菌次级代谢研究, E-mail: [ivory\\_cnu@163.com](mailto:ivory_cnu@163.com); 向四海 (1976 - ), 男, 湖南人, 博士研究生, 主要从事工业微生物的代谢工程改造。

收稿日期: 2009-04-16; 修回日期: 2009-05-06



卡那霉素抗性基因的片段,然后插入 pZW121,得到 pZW221。pZW121 已含有 *PermE* \*。

**1.4.3 pEN152 的构建:**以 pIJ4083 为模板,用引物 1 (表 1)扩增 *xylE* 片段。经 *NotI* 和 *EcoRI* 双酶切后,与 *Not I* 和 *EcoR I* 双酶切的 pEN152 连接,得到 pEX152。

**1.4.4 pFX152 的构建:**以 *BamHI* 和 *EcoRI* 酶切 pEN152,回收得到含有 *xylE* 的片段插入 pKC-psf,得到 pFX113。以 pFX113 为模板,用引物 2(表 1)扩

增得到含有 *psf-xyle* 的片段,回收后 *EcoRI* 酶切,插入质粒 pSET152,得到 pFX152。

### 1.5 卡那霉素抗性梯度实验

通过接合转移的方法将构建好质粒转入棒状链霉菌中。然后比较带有不同启动子的重组菌株在 YD 培养基上的卡那霉素抗性表达情况。在含有不同卡那霉素浓度的培养基上培养重组菌,卡那霉素梯度为 100 ~ 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,菌株 30 $^{\circ}\text{C}$  培养四天观察结果。

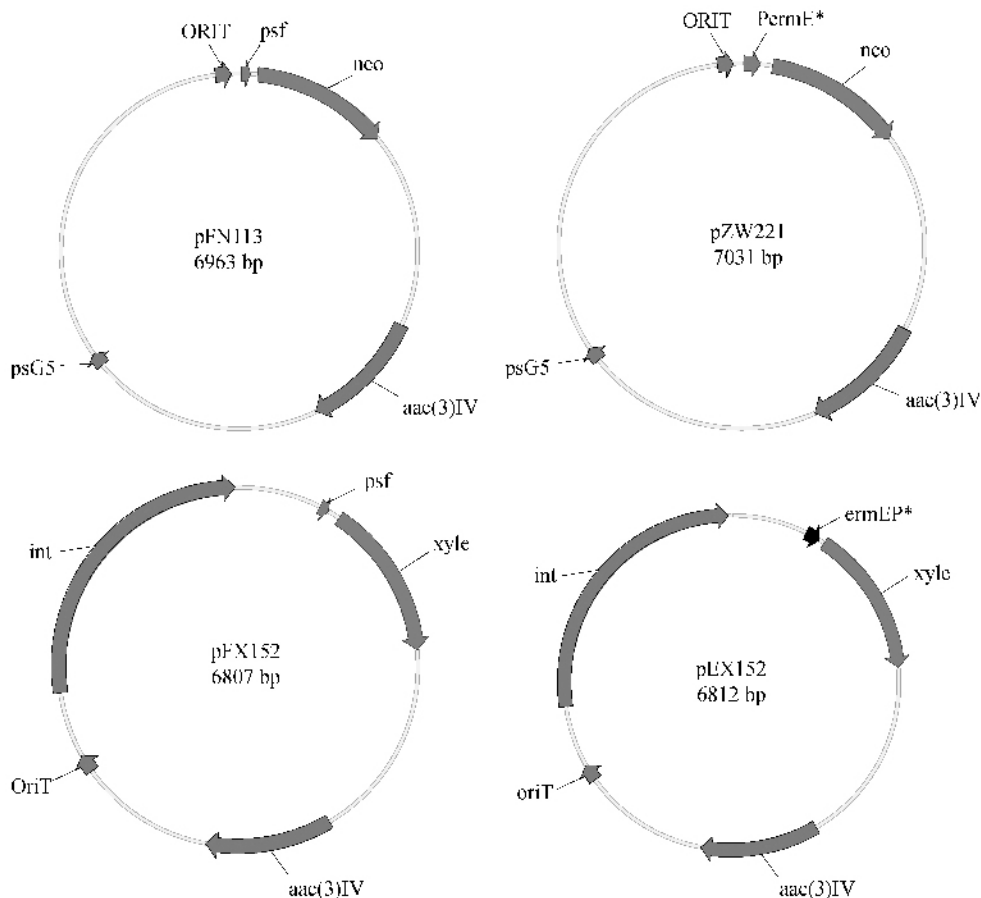


图 2 质粒 pFN113, pZW221, pFX152 和 pEN152 的示意图

Fig.2 Maps of plasmids pFN113, pZW221, pFX152 and pEN152.

## 2 结果

### 2.1 卡那霉素抗性梯度实验

通过接合转移的方法将构建好的 pFN113 和 pZW221 两个质粒转入棒状链霉菌中。实验结果显示,两种启动子均能使卡那霉素抗性基因在棒状链霉菌中表达,并且都使菌株的卡那霉素抗性水平达到 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,说明它们都是高强度的启动子。带有卡那霉素抗性基因而没有启动子的重组质粒,以同样的方法转入链霉菌作为对照,仅能在卡那霉素

浓度为 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 YD 培养基上生长(结果没有显示)。

### 2.2 XylE 显色法比较启动子活性

卡那霉素抗性实验通过重组菌的卡那霉素抗性水平反映在不同启动子下卡那霉素抗性基因的表达效率,是一种粗略的、半定量的方法。为了进一步定量测量并比较两种启动子的活性,我们采用了 XylE 显色法,使用紫外测定 2-羟粘糠酸半醛的生成量,直接确定 XylE 活性,并去除了菌体生长量的影响,因而是一种直接而准确的方法。

通过接合转移的方法将构建好的 pFX152 和 pEN152 两个质粒转入棒状链霉菌中。重组菌 3585: pFX152, 3585: pEN152 长出孢子后接种至 YD 液体培养基发酵培养 3 d。然后用 XylE 显色法测量启动子的表达活性。表 2 为两个启动子在 YD 培养基上的表达差异。

实验数据表明, 在棒状链霉菌中 *Psf* 的表达活性要略高于 *PermE* \*, *t* 检验证明在 0.05 水平有显著性差异。也再次印证 *Psf* 是一个高表达活性的启动子。

表 2 XylE 显色法测量启动子在棒状链霉菌中表达活性

Table 2 Evaluation of promoter activities in *S. clavuligerus* by measuring XylE activities

A375/ cell dry weight(A/g)	<i>Psf</i>	<i>PermE</i> *
1	1.727	1.343
2	2.170	1.397
3	1.752	1.328
$\bar{x} \pm sd$	1.883 ± 0.249	1.356 ± 0.036

$p = 0.02217$

### 2.3 两个启动子在其他链霉菌中的比较

将构建好的质粒 pFX152 和 pEN152 分别通过接合转移的方法转入天蓝色链霉菌, 委内瑞拉链霉菌和变铅青链霉菌。并采用上述同样的方法, 即利用检测菌体中的 XylE 活性的方法间接测量启动子活性。表 3 为两个启动子的活性差异, 这里采用 MS 培养基。实验数据为一次实验结果, 结果说明, *Psf* 在天蓝链霉菌中的表达活性要略高于 *PermE* \*。但在委内瑞拉链霉菌和变铅青链霉菌中则相反。

表 3 XylE 显色法测量启动子在不同链霉菌中表达活性

Table 3 Evaluation of promoter activities in different Streptomyces by measuring XylE activities

A375/cell dry weight(A/g)	<i>S. coelicolor</i> M145	<i>S. venezuelae</i>	<i>S. lividans</i>
<i>Psf</i>	3.347	2.118	1.439
<i>PermE</i> *	2.677	3.060	2.201

## 3 讨论

在 *Psf* 区域中, *Psf* I 启动子的 -10 和 -35 区保守序列的间隔符合原核生物强启动子的最佳间隔, *Psf* II 启动子的间隔区则要长一些, 表达活性可能会弱于 *Psf* I 的表达活性。而且, *Psf* 可以在大肠杆菌中表达。在表 4 中对比了一些启动子的 -35 和 -10 区的序列。从序列比较可以看出, *Psf* II 启动子与典型原核生物启动子相似; *Psf* I 启动子的 -35 区与典型原核生物启动子相似, -10 区则不同。

表 4 启动子 -35 区和 -10 区的序列比较

Table 4 Comparison of the potential -10 and -35 sequences of different promoters

Promoter	Nucleotide sequence		
	-35 region	Distance/bp	-10 region
Streptomyces promoters with sequences similar to <i>E. coli</i> promoters <sup>[14]</sup>	TTGAC(Pu)	16-18	TAg (Pu) (Pu)T
<i>PermE</i> I	TGGACA	14	TAGGAT
<i>PermE</i> * I	GGCACA	14	TAGGAT
<i>PermE</i> II	TTGACC	18	GAGGAT
<i>Psf</i> I	TTGATG	17	ATCAAT
<i>Psf</i> II	TTGACC	19	TACAAT
<i>E. coli</i>	TTGACa	17	TATaAT <sup>b</sup>

Pu: purine base; <sup>b</sup> Small letters mean lower conservation of T or A

本研究构建的质粒 pFN113 和 pZW221, pFX152 和 pEN152 分别在报告基因前面插入 *Psf* 或 *PermE* \* 启动子, 质粒其余部分均相似或相同。因此两种质粒介导的报告基因表达水平的不同, 应取决于两个启动子的强弱。在显色实验中使用 pSET152 质粒作为载体而不继续使用 pKC1139 质粒, 是因为 pKC1139 是一种温度敏感型, 多拷贝的质粒, 它在菌体中的拷贝数是不固定的。启动子的表达差异有可能是由于拷贝数的不同而出现误差。而 pSET152 是整合型的质粒, 它可以整合到菌株的染色体上, 一个染色体一个拷贝, 这样就避免了启动子拷贝数不一样引起的实验误差。

通过对比实验, 我们可以看出 *Psf* 是一种强的组成型启动子, 它与 *PermE* \* 的表达活性在不同的菌株中有一定差异, 这可能与不同菌株对营养需求和  $\sigma$  因子组成不同有关。 $\sigma$  因子是一类与 RNA 聚合酶结合的蛋白, 它能引导 RNA 聚合酶识别特异启动子序列, 启动目的基因的转录。所有细菌都含有多个  $\sigma$  因子, 识别不同的启动子序列。而不同菌种的同功能的  $\sigma$  因子也不完全相同, 在序列和活性上表现出一定得差异, 所以同一启动子在不同菌种中的活性也不完全相同。启动子活性差异还与相关  $\sigma$  因子表达模式有关。总之, *Psf* 是一个活性很强的启动子, 在多种链霉菌中表现出很高活性, 是在以后的实验中加以利用的启动子。

实验中利用抗性梯度的方法比较两个启动子的表达活性, 但是由于两者都是高活性的启动子, 使得抗性比较的方法显示不出两者的差异。改用 *xylE* 基因显色方法比较两者的表达差异后, 再次显示了两者的强启动子活性, 并能定量地反映出两种启动子在不同宿主中表达活性的差异。

致谢 感谢中国科学院上海植物生理生态研究所赵国平教授提供的 pIJ4083 ,中国科学院微生物研究所郑舰艇博士提供的质粒 pZW121。感谢中国科学院微生物研究所范克强老师和田秀云博士对文章写作的修改帮助。

## 参考文献

- [ 1 ] 杨闰英,胡志浩,邓子新,等. 链霉菌表达系统的研究进展. 农业生物技术学报( *Journal of Agricultural Biotechnology* ), 1996,4(3): 260 – 268.
- [ 2 ] Bibb MJ, Janssen GR, Wand JM. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance (ermE) gene of *Streptomyces erythraeus*. *Gene*, 1985, 38: 215 – 226.
- [ 3 ] 张长生,张惠展. 链霉菌 RNA 聚合酶的异质性和启动子的多样性. 国外医药抗生素分册( *World Notes on Antibiotics* ), 1997,18(4): 248 – 250.
- [ 4 ] Schmitt JT, Engels JW. Promoter constructions for efficient secretion expression in *Streptomyces lividans*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1992, 36: 493 – 498.
- [ 5 ] Bibb MJ, Janssen GR. Construction and characterization of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. *Molecular and General Genetics*, 1986, 203: 468 – 478.
- [ 6 ] Gabriele L, Mervyn B, Wolfgang W. Isolation and characterization of a strong promoter element from the

- Streptomyces ghanaensis* phage I19 using the gentamicin resistance gene (aacC1) of Tn1696 as reporter. *Microbiology*, 1997, 143, 1503 – 1512.
- [ 7 ] Hawley DK, McClure WR. Compilation and analysis of Escherichia coli promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 1983, 11: 2237 – 2255.
- [ 8 ] 薛丽香,童坦君,张宗玉. 报告基因的选择及其研究趋向. 生理科学进展( *Progress in Physiological Sciences* ), 2002, 33(4): 364 – 366.
- [ 9 ] 夏东翔,汪美先. 邻苯二酚 2,3-双加氧酶显色标志基因研究进展. 生物工程进展( *Progress in Biotechnology* ), 1998,13(5): 26 – 29.
- [ 10 ] 周鑫淼,陈洁君,耿立召,等. 邻苯二酚 2,3-双加氧酶的结构和功能研究进展. 生物技术通报( *Biotechnology Bulletin* ), 2007, 4: 51 – 54.
- [ 11 ] Timothy MC, Mervyn JB. Streptomyces promoter-probe plasmids that utilise the xylE gene of Pseudomonas putida. *Nucleic Acids Research*, 1989, 18(4): 1077.
- [ 12 ] Tobias K, Bibb MJ, Mark JB. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [ 13 ] Sambrook J, Fritsh E, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [ 14 ] Strohl WR. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20: 961 – 974.

## Evaluation of the activities of two promoters in Streptomyces by reporter gene method

Jia Li<sup>1#</sup>, Sihai Xiang<sup>2#</sup>, Xiushan Yang<sup>1\*</sup>, Keqian Yang<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> School of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

(<sup>2</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** [Objective] The mutated promoter of the erythromycin resistance gene (*PermE\**) is a strong promoter generally used in streptomycetes, and we evaluated the expression activities of a new promoter (*Psf*) and *PermE\** in Streptomyces. [Methods] We used kanamycin resistance gene (*neo*) and catechol 2,3-dioxygenase gene (*xylE*) as reporters. [Results] Both promoters exhibited high level of promoter activities in *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585, *Streptomyces coelicolor* M145, *Streptomyces venezuelae* ISP5230 and *Streptomyces lividans* TK54. The activities of *Psf* were higher than those of *PermE\** in *S. clavuligerus* and *S. coelicolor*. [Conclusion] Both *Psf* and *PermE\** are strong promoters suitable for gene over-expression in Streptomyces and *Psf* will offer an alternative for high-level gene expression.

**Keywords:** strong promoter; Streptomyces; reporter gene

( 本文责编 : 王晋芳 )

\* Corresponding authors. Tel: +86-10-68902330, E-mail: cnu\_xsyang@263.net; Keqian Yang, Tel: +86-10-64807459, E-mail: yangkq@im.ac.cn

# These authors contributed equally to this work.

Received: 16 April 2009/Revised: 6 May 2009